

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian Peternakan, Universitas Muhammadiyah Malang. Penelitian berlangsung pada bulan Juli 2017 sampai dengan Januari 2018.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam pembuatan *gelling agent* dan selai lembaran buah naga merah meliputi timbangan analitik merk *Pioneer ohaus*, baskom, pisau, tatakan, panci, spatula, kompor, termometer, blender merk *Philips*, kain saring, freezer, kabinet, gelas ukur merk *Iwaki pyrex*, *baker glass* merk *Iwaki pyrex*, saringan, loyang.

Alat Analisa fisikokimia selai lembaran buah naga merah meliputi cawan porselen, oven, desikator merk *Glaswerk Wertheum 6132*, erlenmeyer 300 ml merk *Iwaki pyrex*, pendingin balik, *hot plate*, timbangan analitik, *baker glass*, gelas ukur, pipet ukur merk *pyrex*, *water bath* merk *Digital Termostal*, tabung reaksi, fortex, spektrofotometer UV, pH meter, *colour reader* merk *Konica minolta*, *texture analyzer* merk *Brookfield CT3*.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan *gelling agent* dan selai lembaran buah naga merah meliputi yaitu rumput laut *Gracilaria sp*, rumput laut *Euchema cottoni*, buah naga merah dengan tingkat kematangan *ripening*, Na(OCl), NaOH, KOH, CH₃COOH, aquades, gula, asam sitrat, agar-agar komersil, karagenan komersil, pH universal, plastik.

Bahan Analisa fisikokimia selai lembaran buah naga merah meliputi H_2SO_4 0,3 N, kertas saring, kertas saring whatman, NaOH, pH universal, K_2SO_4 10 %, alkohol 95%, glukosa, aquades, pereaksi anthrone, HCL 0,05 N, phenolphetalain, CH_3COOH , CaCl_2 1N, serbuk DPPH, etanol, methanol, aluminium foil.

3.3 Metode Penelitian

Rancangan percobaan pada penelitian ini dilakukan secara percobaan (eksperimen). Penelitian yang dilakukan untuk mengetahui kualitas selai lembaran dengan variasi jenis dan konsentrasi *gelling agent* menggunakan desain nested (tersarang) dengan dua faktor. Faktor I yakni jenis *gelling agent* dengan 4 level dan faktor II yakni konsentrasi *gelling agent* dengan 3 level serta terdapat 1 kontrol (konsentrasi *gelling agent* 0%) sehingga diperoleh 13 kombinasi. Setiap kombinasi perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

a. Faktor I jenis *gelling agent* (J) :

J1 = Hasil ekstraksi agar-agar

J2 = Hasil ekstraksi ATC

J3 = Agar-agar komersil

J4 = Karagenan komersil

b. Faktor konsentrasi *gelling agent* (K) :

K1 = 1%

K2 = 2%

K3 = 3%

Matriks Kombinasi Perlakuan

	J1	J2	J3	J4
K1	J1K1	J2K1	J3K1	J4K1
K2	J1K2	J2K2	J3K2	J4K2
K3	J1K3	J2K3	J3K3	J4K3

Keterangan :

JK0 : Selai lembaran tanpa penambahan *gelling agent* (Kontrol)

J1K1 : Kombinasi hasil ekstraksi agar-agar dengan konsentrasi 1%

J1K2 : Kombinasi hasil ekstraksi agar-agar dengan konsentrasi 2%

J1K3 : Kombinasi hasil ekstraksi agar-agar dengan konsentrasi 3%

J2K1 : Kombinasi hasil ekstraksi ATC dengan konsentrasi 1%

J2K2 : Kombinasi hasil ekstraksi ATC dengan konsentrasi 2%

J2K3 : Kombinasi hasil ekstraksi ATC dengan konsentrasi 3%

J3K1 : Kombinasi agar-agar komersil dengan konsentrasi 1%

J3K2 : Kombinasi agar-agar komersil dengan konsentrasi 2%

J3K3 : Kombinasi agar-agar komersil dengan konsentrasi 3%

J4K1 : Kombinasi karagenan komersil dengan konsentrasi 1%

J4K2 : Kombinasi karagenan komersil dengan konsentrasi 2%

J4K3 : Kombinasi karagenan komersil dengan konsentrasi 3%

Parameter pengamatan dilakukan dengan menganalisa pada selai lembaran meliputi karakter kimia (kadar air, antioksidan, antosianin, kadar serat, kadar gula total, total padatan terlarut, dan pH), karakter fisik (kekuatan gel dan warna) dan organoleptik (uji hedonik aroma, warna, rasa, tekstur, dan kesukaan) dan penentuan perlakuan terbaik dilakukan dengan uji efektivitas (De Garmo *et al*, 1984).

3.4 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap. Tahap pertama yaitu ekstraksi agar-agar dari rumput laut jenis *Gracilaria* dan tepung ATC (*Akali Treated Cottoni*) dari rumput laut jenis *Euchema*, tahap kedua yakni proses pembuatan selai lembaran dengan penambahan *gelling agent* sesuai perlakuan dengan berbagai konsentrasi. Kemudian dilanjutkan dengan pengujian kualitas yang terdapat pada selai lembar buah naga merah.

3.4.1 Proses Pembuatan Tepung Agar-agar dari Rumput Laut Jenis *Gracilaria* (Modifikasi Utomo et al., 1991 dalam Karyadi, R, 2002)

Rumput laut *Gracilaria* ditimbang sebanyak 250 g. Rumput laut dicuci sampai bersih dan dilanjutkan dengan direndam selama 2 jam lalu dikeringkan. Kemudian rumput laut direndam Na(OCl) 0,25% selama 1 jam untuk memutihkan rumput laut, kemudian dicuci sampai pH netral. Selanjutnya rumput laut dipanaskan pada larutan NaOH 3% dengan suhu 70-80°C selama 1 jam, lalu dicuci kembali sampai pH netral. Rumput laut dihaluskan dengan aquades dengan perbandingan rumput laut dan aquades (1:10). Rumput laut dilanjutkan dengan pemanasan selama 2 jam pada suhu 90–95°C yang sebelumnya sudah ditambahkan CH₃COOH sampai pH 6. Setelah perebusan rumput laut disaring dengan kain saring yang ampasnya dapat diekstrak berkali-kali sampai filtrat tidak mengandung agar lagi. Filtrat dari pemerasan bubur rumput laut didiamkan selama 24 jam sampai menjedal dan dilanjutkan dengan penyimpanan dalam *freezer* selama 24 jam lalu thawing selama 24 jam. Kemudian agar dikeringkan dalam kabinet dengan suhu 55°C selama 48 jam. Agar yang sudah kering dihaluskan dengan blander sampai terbentuk bubuk agar.

3.4.2 Proses Pembuatan Tepung ATC (*Alkali Treated Cottoni*) dari Rumput Laut jenis *Euchema* (BRKP, 2003)

Rumput laut *Euchema* kering ditimbang 250 g, lalu direndam dengan air selama 60 jam dengan mengganti air setiap 4 jam. Setelah itu rumput laut dikeringkan mencapai kadar air 30%. Selanjutnya menimbang 12,5 g rumput laut kering. Rumput laut dipanaskan dengan menggunakan larutan KOH 0,5 N dengan perbandingan 1:20 (rumput laut : larutan KOH) selama 3 jam pada suhu 80°C dalam *waterbath*, dengan perbandingan untuk larutan KOH 7 gram + 250 ml aquades. Hasil pemanasan kemudian disaring dan dicuci sampai pH netral. Rumput laut dihaluskan dengan penambahan air dengan perbandingan air dan rumput laut (4:1). Selanjutnya bubur rumput laut dicuci dengan aquades panas sampai bubur rumput laut berwarna putih. Kemudian bubur rumput laut dikeringkan dalam kabinet dengan suhu 50°C selama 48 jam. ATC kering lalu dihaluskan dan diayak dengan ayakan 80 mesh hingga terbentuk tepung.

3.4.3 Proses Pembuatan Selai Lembar Buah Naga Merah (Modifikasi Facruddin, 2008)

Buah naga dipisahkan dari kulitnya dan dipotong-potong sehingga dapat mempermudah dalam penimbangan dan penghalusan. Buah naga ditimbang sebanyak 100 g pada tiap perlakuan kemudian dihaluskan dengan perbandingan air dan buah naga (1:1). Bubur buah naga dipanaskan dengan suhu 80-90°C selama 10 menit dengan menambahkan gula 50%, asam sitrat 1%, dan jenis dan konsentrasi *gelling agent* sesuai perlakuan. Selai buah naga dicetak dalam loyang ukuran 15x15 cm lalu didiamkan sampai selai dingin.

3.4.4 Analisa Kadar Air (Soedarmadji dkk., 2007)

- 1) Cawan porselen kosong dioven pada suhu 100-105°C selama 24 jam sampai berat stabil.
- 2) Cawan porselen kosong didinginkan dalam desikator 15 menit.
- 3) Cawan porselen kosong ditimbang dan sampel sebanyak 1-2 gram dimasukkan.
- 4) Cawan dikeringkan dalam oven pada suhu 100-105°C selama 3-5 jam.
- 5) Cawan didinginkan dalam desikator kemudian ditimbang, panaskan dalam oven lagi selama 2 jam dan didinginkan lagi dalam desikator lalu ditimbang (Perlakuan ini diulangi sampai tercapai berat konstan yakni selisih penimbangan berturut-turut kurang dari 0,02 gram).
- 6) Kadar air dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\text{Berat awal} - \text{Berat akhir}}{\text{Berat bahan}} \times 100\%$$

Keterangan : Berat awal = (Berat cawan + Berat sampel)

Berat akhir = (Berat cawan + Berat sampel sudah dioven)

3.4.5 Analisa Antioksidan Metode DPPH (Hidayah, 2013)

- a. Pembuatan Larutan DPPH 0,25 mM

- 1) Kebutuhan serbuk DPPH dihitung dengan rumus :

$$\text{Konsentrasi} = \frac{\text{massa (mg)}}{\text{Mr} \times \text{VOLUME (L)}}$$

- 2) Serbuk DPPH dilarutkan dengan etanol 98% pada labu ukur 50 mL hingga batas tera, dan dihomogenkan.
- 3) Larutan DPPH disimpan pada kondisi gelap dan tertutup rapat pada kondisi dingin, serta sesegera mungkin untuk digunakan
- 4) Blanko dibuat dengan mencampurkan 1 ml larutan DPPH dan 4 ml etanol.

b. Ekstraksi Bahan Aktif

- 1) Sampel dihaluskan dengan mortar dan martil.
- 2) Sampel ditimbang sebanyak 1 g ke dalam *tube centrifuge*.
- 3) Larutan ditambahkan etanol 98% sebanyak 9 ml.
- 4) Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 4000 *rpm* selama 10 menit.
- 5) Supernatan dipisahkan untuk uji aktivitas antioksidan.

c. Analisis Aktivitas Antioksidan

- 1) Supernatan diambil sebanyak 4 ml ke dalam tabung reaksi.
- 2) Larutan DPPH 0,25 mM ditambahkan sebanyak 1ml dan dihomogenkan.
- 3) Mulut tabung ditutup dengan *plastic wrap*, dan badan tabung ditutup dengan pelapis gelap.
- 4) Sampel disimpan pada kondisi gelap selama 30 menit (larutan DPPH radikal akan berubah warna dari ungu menjadi kuning pucat).
- 5) Absorbansi larutan sampel diukur dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 517 nm (As).
- 6) Inhibisi dihitung dengan rumus dibawah ini :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

3.4.6 Analisa Kadar Antosianin dengan Metode *pH Differential* (AOAC, 2005)

a. Pembuatan Larutan *Buffer*

1) *Buffer* pH 1

Larutan KCl : 0,025 M KCl (1,86 g dalam 980 ml akuades)

Untuk membuat *buffer* pH 1, sebanyak 980 mL larutan KCl 0,025 M ditambahkan dengan 6,3 mL HCl 37%.

2) *Buffer* pH 4,5

Larutan Na-asetat : 0,4 M larutan na-asetat (54,43 g dalam 960 mL akuades)

Untuk membuat *buffer* pH 4,5, sebanyak 960 mL larutan natrium asetat 0,4 M ditambahkan dengan 20 mL HCl 37%.

b. Penentuan Antosianin

- 1) Sampel dilarutkan dalam pelarut metanol asam dengan perbandingan (1:1) ke dalam *beaker glass*.
- 2) Larutan sampel dihomogenkan dan ditutup seluruh bagian wadah dengan penutup gelap.
- 3) Maserasi sampel pada suhu -23°C, selama 1 jam.
- 4) Sampel dimasukkan sebanyak 1 ml masing-masing sampel ke dalam 2 buah tabung reaksi. Tambahkan tabung reaksi pertama dengan larutan *buffer* pH 1 sebanyak 9 ml dan tabung reaksi kedua ditambahkan larutan *buffer* pH 4,5 sebanyak 9 ml.
- 5) *Scanning* antosianin dengan rentang panjang gelombang 400 nm–550 nm pada kedua buffer larutan sampel ekstrak untuk mengetahui panjang gelombang maksimal antosianidin yang dimiliki oleh sampel ekstrak.
- 6) Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang maksimal dan panjang gelombang 700 nm pada masing-masing sampel dan hasilnya dikalkulasi berdasarkan persamaan berikut :

$$A = (A_{\text{vis-maks}} - A_{700\text{nm}})_{\text{nilai pH1}} - (A_{\text{vis-maks}} - A_{700\text{nm}})_{\text{nilai pH4,5}}$$

$$\text{Konsentrasi Antosianin (mg/L)} = \frac{A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000}{\epsilon \times l}$$

Keterangan :

A = Absorbansi

MW = *Molecular Weight* (Berat molekul sianidin glukosida = 449,2)

DF = *Dilution factor* (Faktor Pengenceran = 10 mL/0,1 mL)

ϵ = Absorptivitas molar / koefisien ekstingsi molar (29.600 L cm^{-1})

l = Lebar kuvet (1 cm)

3.4.7 Analisa Kadar Gula Total Metode Anthrone (Apriyanto dkk., 1998)

a. Prosedur Pembuatan Larutan Anthrone

- 1) Anthrone dicampurkan dengan asam sulfat pekat dengan perbandingan berat anthrone 0,1% dari 0,5 ml asam sulfat pekat.

b. Prosedur Pembuatan Kurva Standar

- 1) Glukosa standar dilarutkan sebanyak 0,6 mg dalam 3 ml aquades.
- 2) Encerkan larutan dengan aquades sehingga diperoleh konsentrasi 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 ppm.
- 3) Tambahkan 5 ml pereaksi anthrone pada masing-masing larutan tersebut kemudian ditutup dalam keadaan gelap dan dihomogenkan.
- 4) Larutan ditempatkan pada penangas air (*water bath*) 100°C selama 12 menit, dan didinginkan dengan air mengalir kemudian dilanjutkan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang 630 nm.

c. Prosedur Penetapan Sampel

- 1) Sampel ditimbang sebanyak 5 g yang sudah dihaluskan.
- 2) Tambahkan alkohol dengan perbandingan alkohol dan sampel (2:1), lalu dihomogenkan dengan *fortex*.
- 3) Suspensi disaring dengan kapas jenuh diatas erlenmeyer dan dinetralkan dengan penambahan CaCO_3 .
- 4) Panaskan suspensi diatas *hot plate* selama 30 menit.

- 5) Suspensi disaring kembali sampai terdapat larutan sampel yang jernih.
- 6) Sampel dipipet sebanyak 1 ml kedalam tabung reaksi.
- 7) Lakukan tahap 3 dan 4 seperti pada pembuatan kurva standar.
- 8) Konsentrasi gula total pada sampel ditentukan dengan rumus :

$$\text{Gula Total} = \frac{\text{mg glukosa} \times \text{fp} \times 100}{\text{Berat bahan} \times 1000}$$

3.4.8 Analisa Kadar Serat Kasar (AOAC, 1995)

- 1) Timbang sampel sebanyak ± 1 g dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml.
- 2) Tambahkan dengan 0,68 ml H_2SO_4 dan 100 ml aquades di bawah pendingin balik kemudian dididihkan selama 30 menit dengan digoyang-goyangkan.
- 3) Saring suspensi dengan kertas saring yang sudah setimbang bobotnya, residu yang didapat dicuci dengan air mendidih netral.
- 4) Residu ditimbang ke dalam erlenmeyer, sedangkan yang tertinggal di kertas saring dicuci kembali dengan 1,25 g NaOH dan 100 ml aquades sampai semua residu masuk kedalam erlenmeyer.
- 5) Sampel dididihkan kembali selama 30 menit dan disaring sambil dicuci dengan larutan K_2SO_4 10%.
- 6) Keringkan kertas saring pada oven 110°C sampai berat konstan lalu ditimbang.
- 7) Kadar serat dihitung dengan rumus :

$$\text{Serat Kasar} = \frac{(\text{Berat kertas akhir} - \text{Berat kertas awal})}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

3.4.9 Analisa Total Padatan Terlarut (Sudarmadji dkk., 2004)

- 1) Timbang 5 g sampel yang telah dihaluskan dan mengencerkan dengan aquades.
- 2) Larutan dihomogenkan sampel dengan *fortex*.

- 3) Teteskan 2-3 tetes larutan sampel dalam *handrefraktometer*, lalu diarahkan pada cahaya dan membaca angka di titik terang dan gelapnya.
- 4) Perhitungan total padatan terlarut, dengan rumus :

Total padatan terlarut (°Brix) = angka *handrefractometer* x *fp*

3.4.10 Analisa Kadar pH (Badan Standar Nasional, 2004)

- 1) Nyalakan pH meter.
- 2) Elektroda dan *temperature probe* dibilas menggunakan akuades, dan dikeringkan.
- 3) Lakukan kalibrasi dengan elektroda dicelupkan pada larutan penyangga netral (pH 7) serta asam (pH 4) dan dibersihkan.
- 4) Bilas kembali elektroda menggunakan akuades, dan keringkan.
- 5) Celupkan elektroda pada sampel, dengan menekan tombol *Ar (Hold)* dan *Enter* kemudian tunggu pembacaan pada layar stabil serta muncul indikator *autolock* pada layar.
- 6) Nilai yang tertera pada layar digital dicatat dan dibilas elektroda dengan aquades lalu digeringkan dengan tisu.
- 7) Celupkan elektroda pada sampel sampai diperoleh pembacaan skala yang stabil.

3.4.11 Analisa Kekuatan Gel (Handoko, 2011)

- 1) Pasang jig pada lubang alat *texture analyzer*.
- 2) Nyalakan Alat *texture analyzer* dan kalibrasi alat melalui program *Trapezium X*.
- 3) Lakukan *scanning* jarak dan gaya pada sampel.

- 4) Jarak penetrasi sampel diatur setinggi 38 mm, dan batas pemberian tekanan sebesar 100 Newton.
- 5) Lakukan uji pada sampel dan catat nilai *hardness* dan energi yang terbaca pada alat.

3.4.12 Analisa Warna (deMan, 1999)

- 1) Siapkan sampel dalam plastik PP (*polypropilene*) atau plastik transparan.
- 2) Tutup lensa dielepas dan hidupkan *colour reader*.
- 3) Tentukan target L, a, b. dimana, L adalah kecerahan, nilai positif (+) berarti cerah, nilai negatif (-) berarti gelap; Axis a nilai positif (+) berarti merah, nilai (-) berarti hijau ; Axis b, nilai (+) berarti kuning, nilai (-) berarti biru.
- 4) Tombol pengukur warna ditekan.
- 5) Catat nilai yang tertera pada layar digital.

3.4.13 Uji Organoleptik

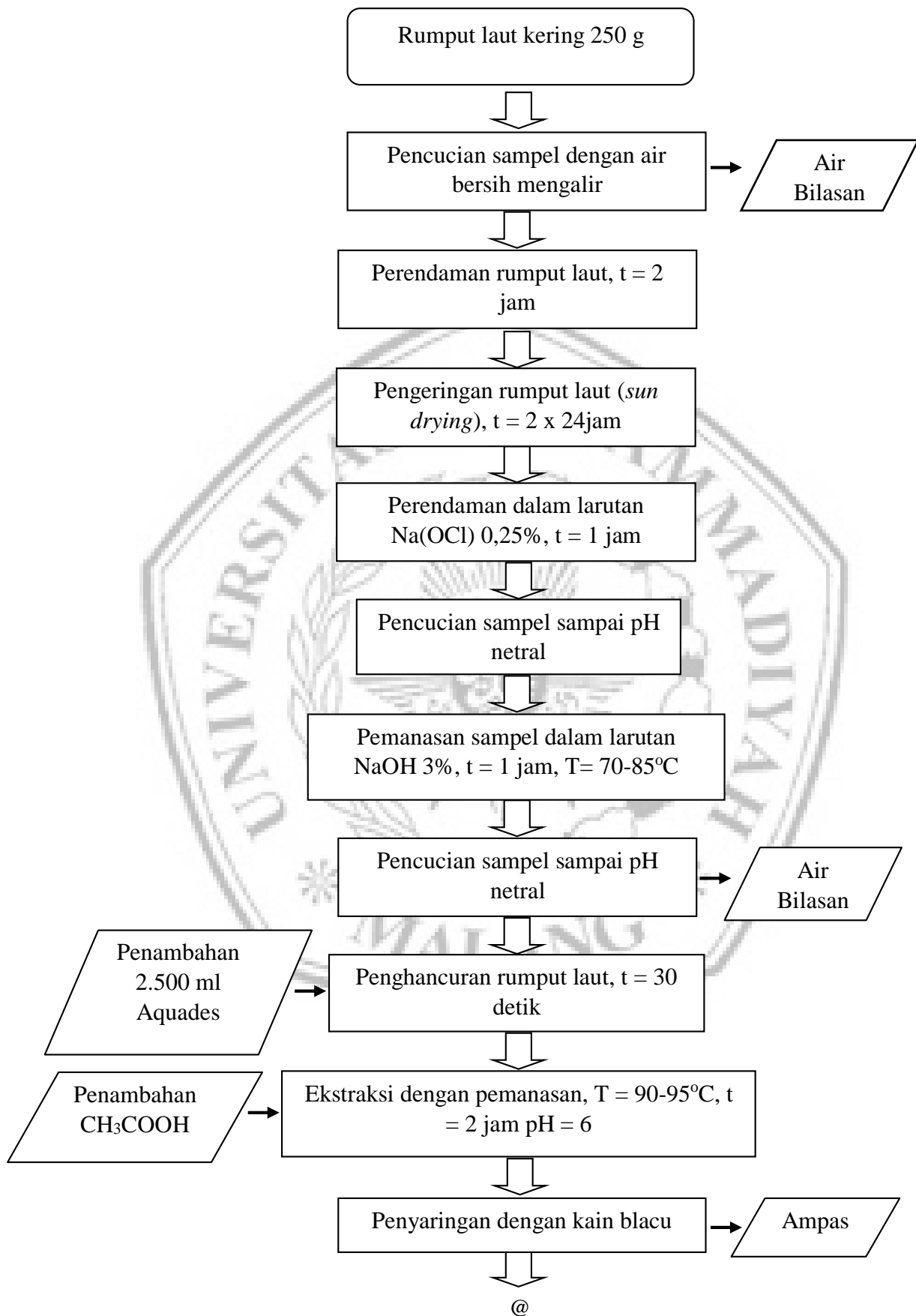
Analisis organoleptik dilakukan untuk mengetahui daya terima produk selai lembaran buah naga merah oleh konsumen melalui beberapa parameter. Analisis organoleptik ini menggunakan metode *hedonic test*. Parameter yang diujikan pada uji organoleptik ini meliputi aroma, warna, rasa, tekstur dan kesukaan. Kisaran nilai skala hedonik berkisar 1-5 pada skala numerik untuk masing-masing parameter. Semakin tinggi nilai yang diberikan maka semakin tinggi pula tingkat kesukaan. Masing-masing sampel akan diberi kode yang berbeda, untuk menghindari terjadinya perbandingan tingkat kesukaan panelis

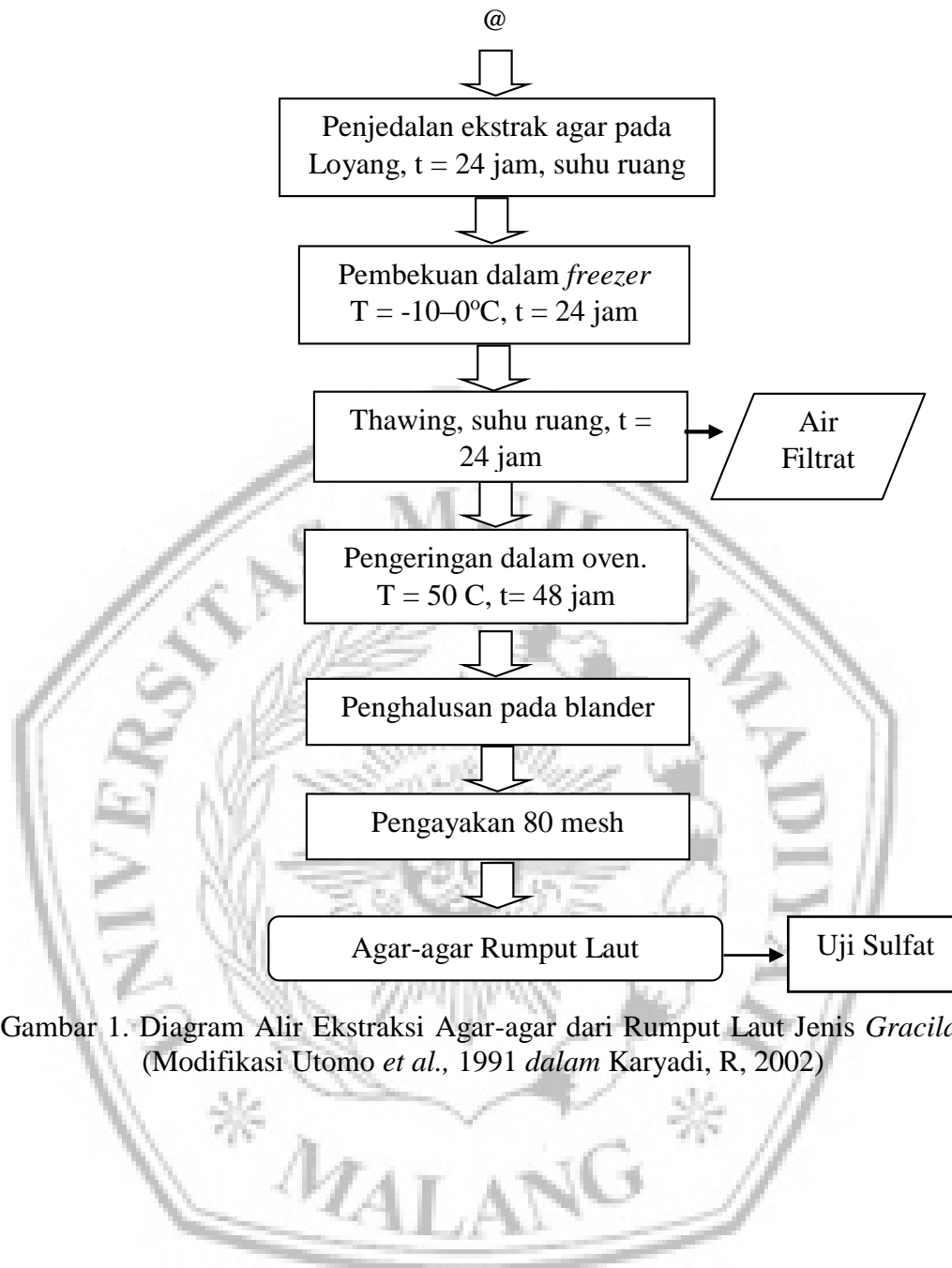
antar sampel. Uji hedonik dilakukan dengan menggunakan panelis tidak terlatih dengan jumlah minimal 30 orang.

3.4.14 Analisa Data

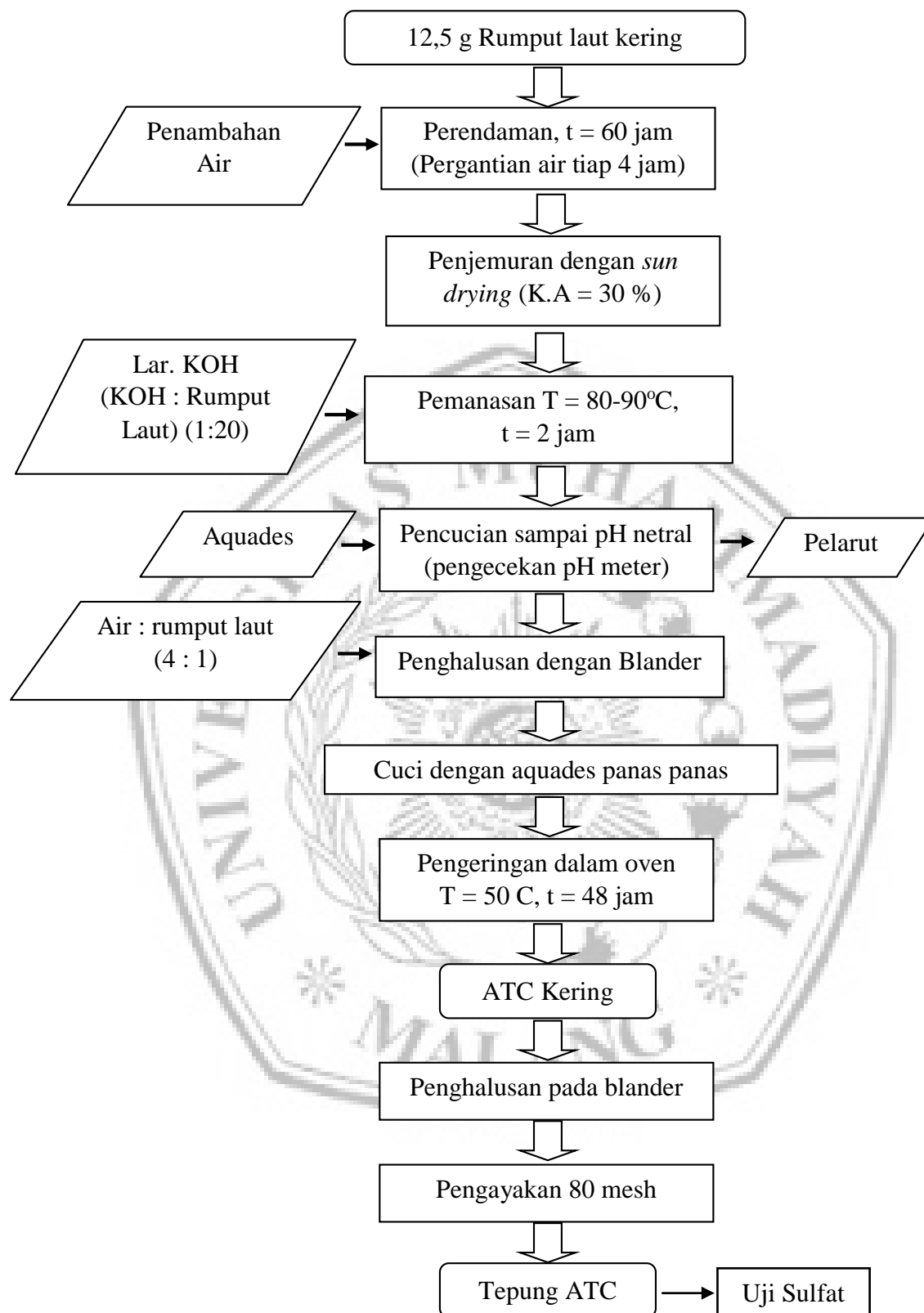
Data pengamatan analisa kimia dan fisik dianalisis menggunakan Sidik Ragam atau ANOVA (*Analysis of Variance*) untuk mengetahui pengaruh dari perlakuan. Apabila hasil analisa menunjukkan pengaruh nyata, maka dilanjutkan dengan uji DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Sedangkan pada uji organoleptik dianalisis menggunakan metode *Kruskall wallis* untuk mengetahui adanya perbedaan signifikan dari perlakuan, apabila terdapat perbedaan maka akan dilanjutkan dengan metode *Mann whitney* untuk mengetahui perbedaan pada tiap perlakuan.

Penentuan perlakuan yang paling baik dengan menggunakan metode indeks efektivitas (*effectiveness index*). Penentuan perlakuan terbaik berdasarkan metode indeks efektivitas (NE) dan nilai produk (NP) yang selanjutnya nilai produk pada setiap parameter dijumlah untuk mendapatkan perlakuan terbaik. Hasil dari perlakuan terbaik akan dibandingkan dengan perlakuan kontrol dengan metode uji *t* (*T test*) untuk mengetahui perbedaan dari perlakuan terbaik dengan kontrol.

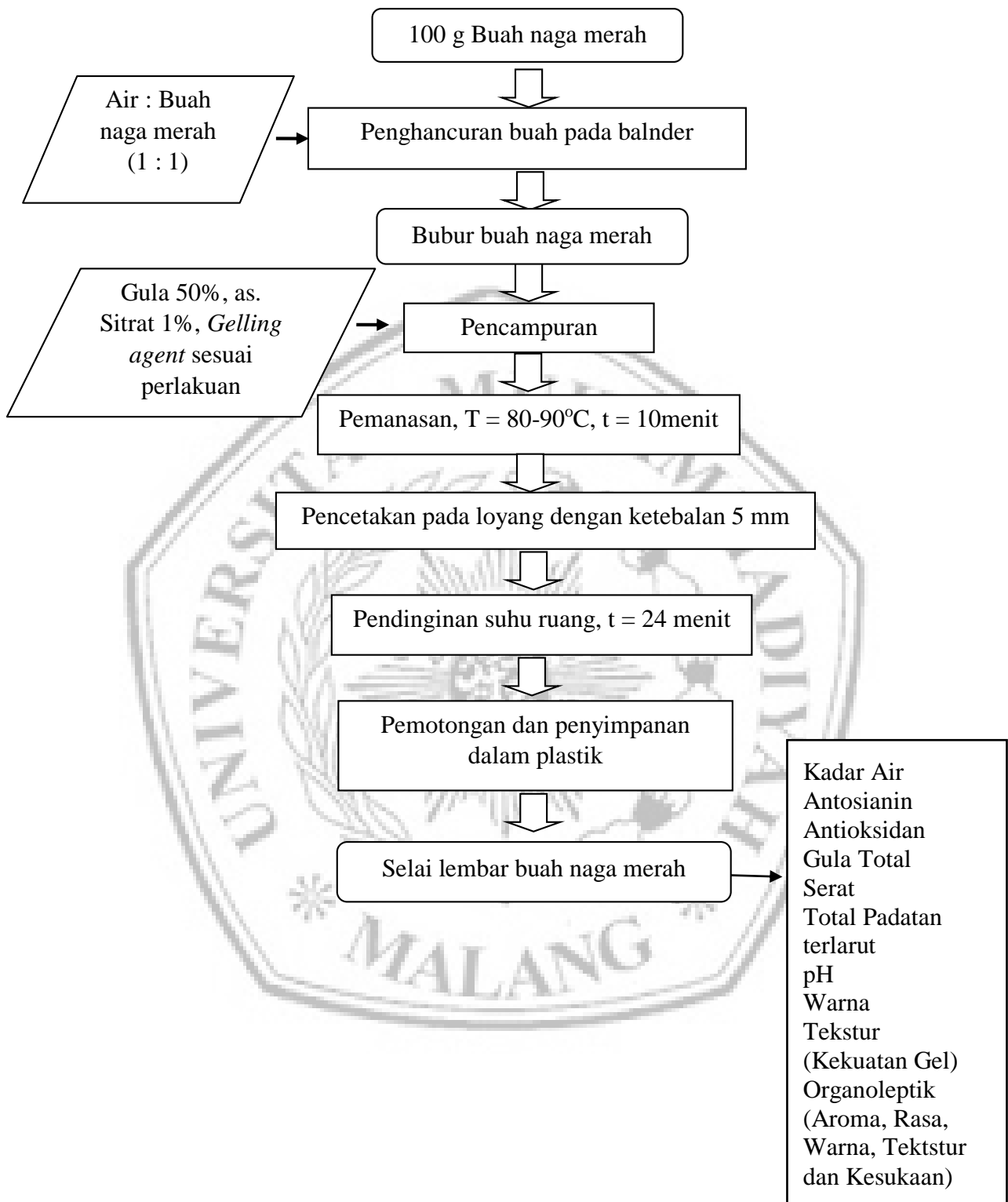




Gambar 1. Diagram Alir Ekstraksi Agar-agar dari Rumput Laut Jenis *Gracilaria* (Modifikasi Utomo *et al.*, 1991 dalam Karyadi, R, 2002)



Gambar 2. Diagram Alir Ekstraksi Tepung ATC dari Rumput Laut Jenis *Eucheuma* (BRKP, 2003)



Gambar 3. Diagram Alir Pembuatan Selai Lembar Buah Naga Merah (modifikasi Facruddin, 2008)